



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **09043237 A**(43) Date of publication of application: **14 . 02 . 97**

(51) Int. Cl.

G01N 33/53
G01N 33/577
(21) Application number: **07216559**(22) Date of filing: **03 . 08 . 95**(71) Applicant: **S R L:KK**
(72) Inventor: **SAKAUCHI SATOKO**
KUBOTA TAKAHIRO
TAKANASHI NAOKI
(54) HYBRIDOMA BORN FROM ANTI-PIKA-2
ANTIBODY AND IMMUNOLOGICAL MEASURING
METHOD

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To quickly, accurately and simply measure PIVKA-2 in a specimen by using at least two kinds of monoclonal antibodies for PIVKA-2.

SOLUTION: A monoclonal antibody which does not react with prothrombin and reacts only with PIVKA-2, and another monoclonal antibody which reacts with both of them are combined and used to obtain excellent responsibility. In the production of these antibodies, an animal is immunized by making an immune source of

human PIVKA-2, and cells born from the obtained antibody is cell-fused with myeloma cells, and detained antigen-forming cell is fused with myeloma cell. For instance, spleen cell suspension of an immunized mouse and the myeloma cell stocks are set in cultivation ground, and a cell fusion agent is added thereto. After fusion reaction processing, centrifuged cells are removed to another cultivation ground for selection, aimed hybridoma (cell fusion) is selected and cloned. The cloned hybridoma is cultivated in a suitable cultivation ground for breeding and a desired monoclonal antibody can be obtained from the supernatant of the cultivation ground.

COPYRIGHT: (C)1997,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-43237

(43) 公開日 平成9年(1997)2月14日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/53			G 0 1 N 33/53	L
33/577			33/577	B

審査請求 有 請求項の数 6 F D (全 26 頁)

(21) 出願番号	特願平7-216559	(71) 出願人	390037006 株式会社エスアールエル 東京都立川市曙町二丁目41番19号
(22) 出願日	平成7年(1995)8月3日	(72) 発明者	坂内 佐登子 東京都八王子市小宮町51 株式会社エスアールエル八王子ラボラトリー内
		(72) 発明者	久保田 隆廣 東京都八王子市小宮町51 株式会社エスアールエル八王子ラボラトリー内
		(72) 発明者	高梨 直樹 東京都八王子市小宮町51 株式会社エスアールエル八王子ラボラトリー内
		(74) 代理人	弁理士 水野 昭宣

(54) 【発明の名称】 抗P I V K A - 2抗体産生ハイブリドーマ及び免疫学的測定方法

(57) 【要約】

【課題】 α フェト・プロテインとは異なる新しい肝癌マーカーあるいは診断のための指標物質として注目されてきているP I V K - 2の簡単且つ感度のよい測定方法をを提供する。

【解決手段】 ヒト肝癌細胞由来のP I V K - 2を抗原性物質として利用し、それに対するモノクローナル抗体を作製する。このモノクローナル抗体の抗原に対する特異性の異なるもの少なくとも2種を混合することで飛躍的にE L I S Aにおける反応性が上がり、測定系の感度上昇の一層の改善を図ることができる。特にプロトンビンの反応性は予想外にも全く抑制される。簡便性及び感度の点でも優れたP I V K A - 2の測定法により、新しい肝癌マーカーとしてP I V K A - 2の測定を臨床診断に利用できる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 検体中のPIVKA-2を測定するにあたり、少くとも2種のPIVKA-2に対するモノクローナル抗体を用いることを特徴とするPIVKA-2の測定方法。

【請求項2】 使用するモノクローナル抗体が、少くとも次の2種：

(i) プロトロンビンとは反応せず且つPIVKA-2とのみ反応するモノクローナル抗体

(ii) プロトロンビンと反応し且つPIVKA-2とも反応するモノクローナル抗体

であることを特徴とする請求項1記載の測定法。

【請求項3】 検体中のPIVKA-2を測定するにあたり、(i) プロトロンビンとは反応せず且つPIVKA-2とのみ反応するモノクローナル抗体、例えば2G4抗体と、(ii) プロトロンビンと反応し且つPIVKA-2とも反応するモノクローナル抗体、例えば1C9抗体とが固相担体に固相化された、混合抗体の固相化された担体を、検体と接触反応させ、次に該担体を必要に応じ洗浄後標識抗プロトロンビン抗体と接触反応させ、次に該担体を必要に応じ洗浄後標識により生ずる信号を検知することにより、PIVKA-2の指標として測定を行うことを特徴とするPIVKA-2の測定方法。

【請求項4】 ヒト肝癌細胞由来PIVKA-2で免疫された脾臓細胞と免疫グロブリンを産生しない腫瘍細胞との融合により得られたハイブリドーマより産生されたヒトPIVKA-2を認識するモノクローナル抗体。

【請求項5】 該モノクローナル抗体が、少くとも次の2種：

(i) プロトロンビンとは反応せず且つPIVKA-2とのみ反応するモノクローナル抗体

(ii) プロトロンビンと反応し且つPIVKA-2とも反応するモノクローナル抗体

であることを特徴とする請求項4記載のモノクローナル抗体。

【請求項6】 該モノクローナル抗体が、2G4及び/又は1C9抗体であることを特徴とする請求項4又は5記載のモノクローナル抗体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、肝癌マーカーあるいは診断のための指標物質として検体中のPIVKA-2を測定し、迅速且つ正確で簡便なPIVKA-2の測定及びそれに基づいた医療上の診断及び治療に役立てることを目指した方法の開発にある。

【0002】

【従来の技術】 PIVKA-2は、血液凝固第II因子であるプロトロンビンの前駆体で、肝細胞内で還元型ビタミンK存在のもとに、NH₂末端近傍10個のグルタミン酸残基(Glu)がビタミンK依存性カルボキシラー

ゼにより、γ-カルボキシグルタミン酸(Gla)に変換されて成熟したプロトロンビンになる。ところが、ビタミンK欠乏状態やワーファリンなどビタミンK拮抗物質の投与などにより、このGluがGlaに変換されないでそのままの異常なプロトロンビンのままで血中に遊離してくることが知られている。この異常なプロトロンビンは、GluがGlaに変換されていないことから、Caイオンとの結合能を持つことができず、その結果正常の凝固活性を有しておらず、血漿中出现するもので、一般的にはこうした異常なプロトロンビンをPIVK-2と呼んでいる。1984年Liebmanらが、肝癌患者にPIVKA-2が高率に検出されることを報告して以来、PIVKA-2は、αフェト・プロテインとは異なる新しい肝癌マーカーあるいは診断のための指標物質として注目されてきている。これまでPIVKA-2の測定はCa塩との結合性の有無を利用した二次元免疫電気泳動法で行ったり、CaまたはBa塩でプロトロンビンを吸着させた後に、異常プロトロンビンの抗原性を測定したりしていたが、それらの方法はその特異性、感度、操作性などの点で問題があった。特にそのプロトロンビン中の僅か10残基中に存在するGlaの一部あるいは大部分がGluとして残存しているか否かをより特異的に且つ感度よく識別することは困難であった。

【0003】 こうした問題点を解決する方法として抗体を利用した免疫学的測定法の開発が進められて来ている。PIVKA-2に特異的なポリクローナル抗体を用いる測定法では感度が低く、環境の上でもまた取扱いの面でも問題の大きい放射性物質を用いなければならないという問題がある。こうした中で、本原らはPIVKA-2を特異的に認識するモノクローナル抗体の作製を報告し、それを用いてより高感度なEIAにより測定をなし得ることが報告されている。こうしたモノクローナル抗体を用いたPIVKA-2の測定法においては、PIVKA-2を特異的に認識するモノクローナル抗体とプロトロンビンに対するポリクローナル抗体との両者を用い、その一方を固定化抗体とし、酵素標識抗体として測定する酵素免疫測定法が採用されている。しかし、この方法では、操作が煩雑で測定に長時間を要するとか、測定感度の点で依然不満が残るとの指摘もある。さらにこうした問題点を解決する方法として、(1) ヒトPIVKA-IIに特異的に反応性を示すが、ヒトプロトロンビンには反応しない第一のモノクローナル抗体群、(2) ヒトプロトロンビンおよびヒトプロトロンビンの両者に反応性を示す第二のモノクローナル抗体群そして(3) ヒトプロトロンビンに反応性を示すがヒトプロトロンビンには反応しない第三のモノクローナル抗体の3種類のモノクローナル抗体を作成し、(A) 上記第一のモノクローナル抗体群と上記第二あるいは第三のモノクローナル抗体群との2種を組み合わせるか、(B) 上記第一のモノクロー

ナル抗体群と上記第二のモノクローナル抗体群と上記第三のモノクローナル抗体群との3種を組合わせて用い、迅速且つ正確で簡便なP I V K A-2の測定を旨とした方法が提案されている。

【0004】

【解決すべき課題】 こうしたことから、簡便に得られるモノクローナル抗体を用い、簡便性及び感度の点でも優れたP I V K A-2の測定法を開発することが課題となっている。また肝臓患者に由来するP I V K A-2と凝固系疾患由来あるいはビタミンK拮抗物質などの薬物投与患者由来のP I V K A-2との3次元構造も含めた同一性については未だ確定された報告はなく、一方肝癌マーカーあるいは診断のための指標物質として利用するためには、肝臓患者に由来するP I V K A-2を測定すべき抗原としてより特異的に認識できるようなモノクローナル抗体が望ましいと考えられるが、これまでは直接肝臓に由来するP I V K A-2を用いてモノクローナル抗体を作製したことは報告がない。

【0005】

【課題を解決すべき手段】 本発明者等は、より特異性に特徴を有し、測定感度の点でも利点を有するP I V K A-2の測定を行なうべく、鋭意研究を行った結果、肝臓細胞株であるPCL/PRF/5 (Alexander) の培養上清より得られたP I V K A-2を抗原として用いることにより、特異性に特徴を有するモノクローナル抗体を作製し得ることを知見し、さらにそうして得られるモノクローナル抗体の複数のものであって、その反応特異性の異なるモノクローナル抗体を組合わせて用いることにより、優れた反応性が得られることを見出し、本発明を完成した。本発明は、検体中のP I V K A-2を測定するにあたり、少くとも二種のP I V K A-2に対するモノクローナル抗体を用いることを特徴とするP I V K A-2の測定方法が提供される。上記方法で用いられる二種のP I V K A-2に対するモノクローナル抗体としては、例えば、(1) プロトロンビンとは反応せず、P I V K A-2とのみ反応するモノクローナル抗体と(2) プロトロンビンとの反応も認められるが、P I V K A-2とも上記(1)のモノクローナル抗体と実質的に同様な反応性を有するモノクローナル抗体との組合せが挙げられるが、その他P I V K A-2に対するモノクローナル抗体という点では一致するが、実質的にその他の特性、例えばプロトロンビン構造のNH₂末端近傍の10個のアミノ酸残基以外の領域の各クリングル領域を特異的に認識することのできるモノクローナル抗体であることができる。

【0006】 さらに本発明に従えば、上記2種以上のモノクローナル抗体に加えて、(i) ヒトプロトロンビン及びヒトプロトロンビンの両者に反応性を示すモノクローナル抗体群、(ii) ヒトプロトロンビンに反応を示すが、ヒトプロトロンビンには反応しないモノクローナル抗体及び

(iii) ヒトプロトロンビンに対するポリクローナル抗体のいずれをも組合わせて用いることができるが、好ましくはモノクローナル抗体を組合せの相手とすることが挙げられる。混合抗体として用いた場合、プロトロンビンの反応性は予想外にも全く抑制される結果が得られた。さらに、例えば単一の抗体のみで用いた場合と少なくとも二種の抗体を混合した場合とで比較したところ、固相抗体の違いによる測定値への影響は認められないばかりか、認識部位の近い抗体を混和して用いることで、飛躍的に反応性が上がり、測定系の感度上昇の一層の改善を図ることができることが観察された。2種類の抗体を混合して用いることで、反応性が上昇するだけでなく、一方の特異性を極立たせる結果を導いている。このようになる要因を説明するのは難しいが、混合することで固相に吸着した際の立体構造の変化から、抗体の親和性が増すのではないかと推測される。P I V K A-2に対するモノクローナル抗体の作製には、免疫原性抗原として使用しうるヒトP I V K A-2が必要である。抗原としてのP I V K A-2の調製は、例えばワーファリンなどビタミンK拮抗物質を投与されている者の血漿を硫酸バリウム、炭酸バリウムなどのアルカリ土金属塩で処理し、プロトロンビンを吸着除去した後イオン交換クロマトグラフィーにかけて、粗精製物を得た後それをプロトロンビンとP I V K A-2のC端側との共通部分に対するポリクローナル抗体を使用したアフィニティークロマトグラフィーにかけてより精製する。こうした天然由来のP I V K A-2の他に、好ましくは培養細胞、例えばP I V K A-2産生株化細胞を用いてP I V K A-2を得ることができる。P I V K A-2産生株化細胞としては、P I V K A-2及びαフェトプロテイン (AFP) 産生細胞などが挙げられ、例えばヒト肝臓癌由来細胞などが含まれる。例えばヒト肝臓癌由来細胞P L C / P R L / 5 (Alexander) などを好適にもちいることができる。このP I V K A-2産生株化細胞は当該分野で知られた培地や培養方法あるいはそれと実質的に同様な方法を用いて培養し、好ましくは例えばワーファリンなどビタミンK拮抗物質存在下に培養し、培養上清中に産生されてくるP I V K A-2を上記したようなイオン交換クロマトグラフィー処理、及びプロトロンビンとP I V K A-2のC端側との共通部分に対するポリクローナル抗体を使用したアフィニティークロマトグラフィー処理により精製されたヒトP I V K A-2が得られる。また、リコンビナントP I V K A-2を用いることができる。こうして調製されたP I V K A-2は、さらに免疫原性コンジュゲートなどにしてもよいが、そのまま適当なアジュバントと混合して動物を免疫するのに使用できる。

【0007】 このように抗原は、各種原料、例えば培養細胞、培養組織など、形質転換体細胞などの抗原産生材料から従来公知の方法、例えば硫酸アンモニウム沈殿法

などの塩析、セファデックスなどによるゲルろ過法、例えばジエチルアミノエチル基あるいはカルボキシメチル基などを持つ担体などを用いたイオン交換クロマトグラフィー法、例えばブチル基、オクチル基、フェニル基など疎水性基を持つ担体などを用いた疎水性クロマトグラフィー法、色素ゲルクロマトグラフィー法、電気泳動法、透析、限外ろ過法、アフィニティ・クロマトグラフィー法、高速液体クロマトグラフィー法などにより精製して得ることができる。好ましくは、ポリアクリルアミド電気泳動、モノクローナル抗体などの抗原を特異的に認識する抗体などを固定化したアフィニティ・クロマトグラフィーなどで処理し精製分離処理できる。さらに P I V K A - 2 は、それを断片化したもの、あるいはクローニングされ、配列決定された c D N A 配列から推定されるアミノ酸配列に基づき特徴的な配列領域を選び、ポリペプチドをデザインして化学合成し、得られたポリペプチド断片であってもよく、その断片を適当な縮合剤を介して種々の担体タンパク質類と結合させてハプテタンパク質の如き免疫原性コンジュゲートとし、これを用いて特定の配列のみを認識できるモノクローナル抗体をデザインするのに用いることもできる。デザインされるポリペプチドには予めシステイン残基などを付加し、免疫原性コンジュゲートの調製を容易にできるようにしておくことができる。担体タンパク質類と結合させるにあたっては、担体タンパク質類はまず活性化されることができる。こうした活性化にあたり活性化結合基を導入することが挙げられる。活性化結合基としては、

(1) 活性化ジチオ基、例えば 2-ピリジルジチオ基など (2) 活性化エステルあるいは活性化カルボキシル基、例えばニトロフェニルエステル基、ペンタフルオロフェニルエステル基、1-ベンゾトリアゾールエステル基、N-スクシンイミドエステル基などが挙げられる。担体タンパク質類としては、キーホール・リンペット・ヘモシアニン (K L H)、牛血清アルブミン (B S A)、卵白アルブミン、グロブリン、ポリリジンなどのポリペプチド、細菌菌体成分、例えば B C G などが挙げられる。

【0008】本発明では、P I V K A - 2 と特異的に結合する少なくとも 2 種のモノクローナル抗体が提供される。本発明に係わるモノクローナル抗体は、本発明により得られる精製されたヒト P I V K A - 2 を免疫原として公知の方法で動物を免疫した後、当該分野で公知あるいはそれと類似の方法で得ることができ、例えばミルシュタインらの方法 (Nature, 256:495~497, 1975) により製造することができる。例えば本発明で使用されるモノクローナル抗体は、(1) 免疫原性抗原による動物の免疫、(2) ミエローマ細胞の準備調製、(3) 抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞融合、(4) ハイブリドーマ (融合細胞) の選択及びモノクローン化、(5) モノクローナル抗体の製造、

(6) 必要に応じて大量取得のための培養・腹水化といった工程で作製入手できる。

免疫原性抗原による動物の免疫

動物を免疫するには、例えば村松繁、他編、実験生物学講座 14、免疫生物学、丸善株式会社、昭和 60 年、日本生化学会編、続生化学実験講座 5、免疫生化学研究法、東京化学同人、1986 年、日本生化学会編、新生化学実験講座 12、分子免疫学 III、抗原・抗体・補体、東京化学同人、1992 年などに記載の方法に準じて行うことができる。抗原と共に用いられるアジュバントとしては、例えばフロイント完全アジュバント、リビ (R i b i) アジュバント、百日咳ワクチン、B C G、リビッド A、リボソーム、水酸化アルミニウム、シリカなどが挙げられる。免疫は、例えば B A L B / c などのマウスをはじめとする動物を使用して行われる。抗原の投与量は、例えばマウスに対して約 1~400 μ g/動物で、一般には宿主動物の腹腔内や皮下に注射し、以後 1~4 週間おきに、好ましくは 1~2 週間ごとに腹腔内、皮下、静脈内あるいは筋肉内に追加免疫を 2~10 回程度反復して行う。免疫用のマウスとしては B A L B / c 系マウスの他、B A L B / c 系マウスと他系マウスとの F1 マウスなどを用いることもできる。必要に応じ、抗体価測定系を調製し、抗体価を測定して動物免疫の程度を確認できる。一方では、本発明に従えばリコンビナント P I V K A - 2 を用い、P I V K A - 2 に対するポリクローナル抗体及びその製造も可能である。こうした場合、使用される動物としては、哺乳動物や鳥類などが利用できるが、例えばウシ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、ブタ、ウサギ、マウス、ラット、モルモット、サル、イヌ、ネコ、ニワトリなどが挙げられる。抗体は抗血清であってもよく、より精製されたものであってもよく、例えばその単離精製は下記モノクローナル抗体と同様にして行うことができる。

【0009】細胞融合前には、まず使用されるミエローマ細胞の調製をして必要がある。細胞融合に使用される無限増殖可能株 (腫瘍細胞株) としては免疫グロブリンを産生しない細胞株から選ぶことができ、好ましくはマウスミエローマ M O P C - 21 セルライン由来の P3-X63-Ag8-U1 (P3U1, Current topics in Microbiol. and Immunol., 81, 1~7, 1978) 以外の細胞株、例えば S P 2 / O - A g 14 (S P 2, Nature, 276, 269~270, 1978)、P3-X63-Ag8 (X63, Nature, 256, 495~497, 1975)、P3-X63-Ag8-653 (653, J. Immunol., 123, 1548~1550, 1979)、P A I、P A I - O などを用いることができる。8-アザグアニン耐性のマウスミエローマ細胞株はダルベッコ MEM 培地 (DMEM 培地)、R P M I - 1640 培地などの通常当該分野で知られた細胞培地に、例えばペニシリン、ストレプトマイシン、アミカシンなどの抗生物質、牛胎児血清 (F C S) などを加え、

さらに8-アザグアニン（例えば5～45 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）を加えた培地で継代されるが、細胞融合の2～5日前に正常培地で継代して所要数の細胞株を用意することができる。また使用細胞株は、凍結保存株を約37℃で完全に解凍したのちRPMI-1640培地などの正常培地で3回以上洗浄後、正常培地で培養して所要数の細胞株を用意したものであってもよい。

【0010】抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞融合は次のようにして実施できる。上記の免疫工程に従い免疫された動物、例えばマウスは最終免疫後、2～5日後にその脾臓が摘出され、それから脾細胞懸濁液を得る。脾細胞の他、生体各所のリンパ節細胞を得て、それを細胞融合に使用することもできる。こうして得られた脾細胞懸濁液と上記の工程に従い用意されたミエローマ細胞株を、例えば最小必須培地（MEM培地）、DME M培地、RPMI-1640培地などの細胞培地中に置き、細胞融合剤、例えばポリエチレングリコールを添加する。好ましくは、例えば30～60%のポリエチレングリコールを0.5～2ml加えることができ、分子量が1,000～8,000のポリエチレングリコールを用いることができ、さらに分子量が1,000～4,000のポリエチレングリコールがより好ましく使用できる。融合培地中でのポリエチレングリコールの濃度は、例えば30～60%となるようにすることが好ましい。必要に応じ、例えばジメチルスルホキシドなどを少量加え、融合を促進することもできる。細胞融合剤としては、この他各種当該分野で知られたものを用いることができ、この様なものとしては不活性化したセンダイウイルス（HVJ: Hemagglutinating virus of Japan）なども挙げられる。融合に使用する脾細胞（リンパ球）：ミエローマ細胞株の割合は、例えば1:1～20:1とすることが挙げられるが、より好ましくは4:1～7:1とすることができる。融合反応を1～10分間行い、次にRPMI-1640培地などの細胞培地を加える。融合反応処理は複数回行うこともできる。融合反応処理後、遠心などにより細胞を分離した後選択用培地に移す。

【0011】こうして得られたハイブリドーマ（融合細胞）は目的のものが選択され、そしてさらにクローン化される。選択用培地としては、例えばヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含む、FCS含有MEM培地、RPMI-1640培地などの培地、所謂HAT培地が挙げられる。選択培地交換の方法は、一般的には培養プレートに分注した容量と当容量を翌日加え、その後1～3日ごとにHAT培地で半量ずつ交換するというようにすることができるが、適宜これに変更を加えて行うこともできる。また融合後8～16日目には、アミノプテリンを除いた、所謂HT培地で1～4日ごとに培地交換をすることができる。フィーダーとして、例えばマウス胸腺細胞を使用することもでき、それが好ましい場

合がある。ハイブリドーマの増殖のさかんな培養ウェルの培養上清を、例えば放射免疫分析（RIA）、酵素免疫分析（ELISA）、蛍光免疫分析（FIA）などの測定系、あるいは蛍光惹起細胞分離装置（FACS）などで、PIVKA-2あるいはその断片ペプチドを抗原として用いたり、あるいは標識抗マウス抗体を用いて目的抗体を測定するなどして、スクリーニングしたり分離する。例えば、スクリーニングの方法は、以下の3法（EIA）で行い、その目的クローンを選択できる；①抗マウスIgG固相-培養上清-ペルオキシダーゼ（POD）標識抗マウスIgGの系を用いてIgG産生クローンをチェックする；②PIVKA-2精製抗原固相-培養上清-POD標識抗マウスIgGの系を用いてPIVKA-2産生クローンをチェックする；及び③プロトンビン抗原固相-培養上清-POD標識抗マウスIgGの系を用いてプロトンビン産生クローンをチェックする。目的抗体を産生しているハイブリドーマをクローニングするが、クローニングには、寒天培地中でコロニーをピック・アップするか、あるいは限界希釈法によりなされる。限界希釈法でより好ましく行うことができる。クローニングは複数回行うことが好ましい。

【0012】こうしてクローン化されたハイブリドーマ（融合細胞）は培養されてモノクローナル抗体の製造に用いることができる。得られたハイブリドーマ株は、FCS含有MEM培地、RPMI-1640培地などの適当な増殖用培地中で培養し、その培地上清から所望のモノクローナル抗体を得ることが出来る。大量の抗体を得るためには、ハイブリドーマを腹水化することが挙げられる。この場合ミエローマ細胞由来の動物と同系の組織適合性動物の腹腔内に各ハイブリドーマを移植し、増殖させるか、例えばヌード・マウスなどに各ハイブリドーマを移植し、増殖させ、該動物の腹水中に産生されたモノクローナル抗体を回収して得ることが出来る。動物はハイブリドーマの移植に先立ち、プリスタン（2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン）などの鉱物油を腹腔内投与しておくことができ、その処理後、ハイブリドーマを増殖させ、腹水を採取することもできる。腹水液はそのまま、あるいは従来公知の方法、例えば硫酸アンモニウム沈殿法などの塩析、セファデックスなどによるゲルろ過法、イオン交換クロマトグラフィー法、電気泳動法、透析、限外ろ過法、アフィニティ・クロマトグラフィー法、高速液体クロマトグラフィー法などにより精製してモノクローナル抗体として用いることができる。好ましくは、モノクローナル抗体を含有する腹水は、硫酸分画した後、DEAE-セファロースの如き、陰イオン交換ゲル及びプロテインAカラムの如きアフィニティ・カラムなどで処理し精製分離処理できる。特に好ましくは抗原又は抗原断片（例えば合成ペプチド、組換え抗原タンパク質あるいはペプチド、抗体が特異的に

認識する部位など)を固定化したアフィニティー・クロマトグラフィー、プロテインAを固定化したアフィニティー・クロマトグラフィーなどが挙げられる。抗体は好ましくは変性処理された精製抗体であることができ、例えば精製抗体の変性処理効果を調べた結果では、2G4抗体においては未処理に比較し変性処理により、抗体の反応性を約10倍程度上昇させることができる。変性試薬としては、例えば6M Guanidinium 塩酸が挙げられる。反応性の上昇する要因としてはIgGのFc部分の変性効果が、固相への吸着能を高めている可能性が考えられ、こうした目的の処理であれば採用可能である。これら抗体をトリプシン、パパイン、ペプシンなどの酵素により処理して、場合により還元して得られるFab、Fab'、F(ab')₂といった抗体フラグメントにして使用してもよい。標識物を付与する抗体としては、IgG画分、更にはペプシン消化後還元して得られる特異的結合部Fab'を用いることができる。

【0013】標識としては、酵素、酵素基質、酵素インヒビター、補欠分子類、補酵素、酵素前駆体、アポ酵素、蛍光物質、色素物質、化学ルミネッセンス化合物、発光物質、発色物質、磁気物質、金属粒子、例えば金コロイドなど、放射性物質などを挙げることができる。酵素としては、脱水素酵素、還元酵素、酸化酵素などの酸化還元酵素、例えばアミノ基、カルボキシル基、メチル基、アシル基、リン酸基などを転移するのを触媒する転移酵素、例えばエステル結合、グリコシド結合、エーテル結合、ペプチド結合などを加水分解する加水分解酵素、リアーゼ、イソメラーゼ、リガーゼなどを挙げることができる。酵素は複数の酵素を複合的に用いて検知に利用することもできる。例えば酵素的サイクリングを利用することもできる。代表的な放射性物質の標識用同位体元素としては、³²P、¹²⁵I、¹³¹I、

[³H]、¹⁴C、³⁵Sなどが挙げられる。代表的な酵素標識としては、西洋ワサビペルオキシダーゼなどのペルオキシダーゼ、大腸菌β-D-ガラクトシダーゼなどのガラクトシダーゼ、マレーエート・デヒドロゲナーゼ、グルコース-6-フォスフェート・デヒドロゲナーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコアミラーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、カタラーゼ、ウシ小腸アルカリホスファターゼ、大腸菌アルカリホスファターゼなどのアルカリ・フォスファターゼなどが挙げられる。アルカリホスファターゼを用いた場合、4-メチルウンベリフェリルフォスフェートなどのウンベリフェロン誘導体、ニトロフェニルホスフェートなどのリン酸化フェノール誘導体、NADPを利用した酵素的サイクリング系、ルシフェリン誘導体、ジオキセタン誘導体などの基質を使用したりして、生ずる蛍光、発光などにより測定できる。ルシフェリン、ルシフェラーゼ系を利用したりすることもできる。カタラーゼを用いた場合、過酸化水素と反応して酸素を生成するので、その酸素を電極など

で検知することもできる。電極としてはガラス電極、難溶性塩膜を用いるイオン電極、液膜型電極、高分子膜電極などであることもできる。酵素標識は、ビオチン標識体と酵素標識アビジン(ストレプトアビジン)に置き換えることも可能である。標識は、複数の異なった種類の標識を使用することもできる。こうした場合、複数の測定を連続的に、あるいは非連続的に、そして同時にあるいは別々に行うことを可能にすることもできる。

【0014】標識するには、チオール基とマレイミド基の反応、ピリジルジスルフィド基とチオール基の反応、アミノ基とアルデヒド基の反応などを利用して行うことができ、公知の方法あるいは当該分野の当業者が容易になしうる方法、さらにはそれらを修飾した方法の中から適宜選択して適用できる。また上記免疫原性複合体作製に使用されることのできる縮合剤、担体との結合に使用されることのできる縮合剤などを用いることができる。縮合剤としては、例えばグルタルアルデヒド、ヘキサメチレンジイソシアネート、ヘキサメチレンジイソチオシアネート、N,N'-ポリメチレンビスヨードアセトアミド、N,N'-エチレンビスマレイミド、エチレングリコールビススクシニミジルスクシネート、ビスジアゾベンジジン、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド、スクシニイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPDP)、N-スクシニイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキササン-1-カルボキシレート(SMCC)、N-スルホスクシニイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキササン-1-カルボキシレート、N-スクシニイミジル-(4-ヨードアセチル)アミノベンゾエート、N-スクシニイミジル-4-(1-マレイミドフェニル)ブチレート、N-(ε-マレイミドカプロイルオキシ)コハク酸イミド(EMCS)、イミノチオラン、S-アセチルメルカプトコハク酸無水物、メチル-3-(4'-ジチオピリジル)プロピオンイミデート、メチル-4-メルカプトブチリルイミデート、メチル-3-メルカプトプロピオンイミデート、N-スクシニイミジル-S-アセチルメルカプトアセテートなどが挙げられる。

【0015】本発明での検知・測定は、イムノ染色、例えば組織あるいは細胞染色、イムノアッセイ、例えば競合型イムノアッセイまたは非競合型イムノアッセイで行うことができ、ラジオイムノアッセイ、ELISA、ラッセックス凝集法などを用いることができ、B-F分離を行ってもあるいは行わないでその測定を行うことができる。好ましくは、ラッセックス凝集法や酵素免疫測定法であり、さらにサンドイッチ型アッセイが挙げられる。例えばサンドイッチ型アッセイでは、PIVKA-2に対する抗体の一方を検出可能に標識化する。同じ抗原を認識できる他の抗体を固相に固定化する。検体と標識化抗体及び固相化抗体を必要に応じ順次反応させるた

めインキュベーション処理し、ここで非結合抗体を分離後、標識物を測定する。測定された標識の量は抗原、すなわち P I V K A-2 の量と比例する。このアッセイでは、不溶化抗体や、標識化抗体の添加の順序に応じて同時サンドイッチ型アッセイ、フォワード (forward) サンドイッチ型アッセイあるいは逆サンドイッチ型アッセイなどと呼ばれる。例えば洗浄、攪拌、震盪、ろ過あるいは抗原の予備抽出等は、特定の状況のもとでそれら測定工程の中で適宜採用される。特定の試薬、緩衝液等の濃度、温度あるいはインキュベーション処理時間などのその他の測定条件は、検体中の抗原の濃度、検体試料の性質等の要素に従い変えることができる。当業者は通常の実験法を用いながら各測定に対して有効な最適の条件を適宜選定して測定を行うことができる。

【0016】例えば本発明に従ったサンドイッチ型アッセイ法を利用する酵素免疫測定法は次のように実施されることができる。測定系は固相、固相化モノクローナル抗体成分としての少なくとも2種の P I V K A-2 に対する抗体 (例えば、(i) プロトロンビンとは反応せず且つ P I V K A-2 とのみ反応するモノクローナル抗体及び (ii) プロトロンビンと反応し且つ P I V K A-2 とも反応するモノクローナル抗体)、標準抗原又は測定用検体試料、酵素標識された抗体 (第二抗体) 及び基質からなる。固相としては以下に説明するようなものを使用できる。モノクローナル抗体成分の固相化は、例えば緩衝液に溶解したモノクローナル抗体成分を固相、例えばポリスチロール製ウェルに入れ、約 4℃ で一晩放置し固相表面をコートすることにより実施できるが、下記で説明する方法を適宜使用できる。コートされていない固相表面などは、牛血清アルブミンなどで処理して非特異的な反応を抑えることがなされうる。標準抗原としては、濃度既知の P I V K A-2 含有血漿などを用いることができる。通常は標準抗原を牛血清アルブミンなどを含有する緩衝液で希釈し、上記コートされたウェルに入れ、反応させてから未反応物などを洗浄除去すればよい。次に酵素標識された抗体 (第二抗体) としては、P O D 標識抗ヒトプロトロンビン抗体が好適に用いることができる。この抗ヒトプロトロンビン抗体は、上記 P I V K A-2 に対する抗体と同様にしてヒトプロトロンビンを抗原として用いて、動物を免疫することにより得られる。使用される動物としては、哺乳動物や鳥類などが利用できるが、例えばウシ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、ブタ、ウサギ、マウス、ラット、モルモット、サル、イヌ、ネコ、ニワトリなどが挙げられる。例えば村松繁、他編、実験生物学講座 14、免疫生物学、丸善株式会社、昭和 60 年、日本生化学会編、続生化学実験講座 5、免疫生化学研究法、東京化学同人、1986 年、日本生化学会編、新生化学実験講座 12、分子免疫学 II I、抗原・抗体・補体、東京化学同人、1992 年などに記載の方法に準じて行うことができる。抗体は抗血清

であってもよく、より精製されたものであってもよく、例えばその単離精製は上記モノクローナル抗体と同様にして行うことができる。抗ヒトプロトロンビンモノクローナル抗体も上記 P I V K A-2 に対する抗体と同様にしてヒトプロトロンビンを抗原として用いて得ることができる。

【0017】抗原あるいは抗体を固相化できる多くの担体が知られており、本発明ではそれらから適宜選んで用いることができる。担体としては、抗原抗体反応などに使用されるものが種々知られており、本発明においても勿論これらの公知のものの中から選んで使用できる。特に好適に使用されるものとしては、例えばガラス、例えば活性化ガラス、多孔質ガラス、シリカゲル、シリカアルミナ、アルミナ、磁化鉄、磁化合金などの無機材料、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、ポリフッ化ビニリデン、ポリ酢酸ビニル、ポリメタクリレート、ポリスチレン、スチレン-ブタジエン共重合体、ポリアクリルアミド、架橋ポリアクリルアミド、スチレン-メタクリレート共重合体、ポリグリシジルメタクリレート、アクロレイン-エチレングリコールジメタクリレート共重合体など、架橋化アルブミン、コラーゲン、ゼラチン、デキストラン、アガロース、架橋アガロース、セルロース、微結晶セルロース、カルボキシメチルセルロース、セルロースアセテートなどの天然または変成セルロース、架橋デキストラン、ナイロンなどのポリアミド、ポリウレタン、ポリエポキシ樹脂などの有機高分子物質、さらにそれらを乳化重合して得られたもの、例えばラテックス粒子 (例えばポリスチレンラテックス粒子、スチレン-ブタジエン共重合体ラテックス粒子など)、細胞、赤血球などで、必要に応じシランカップリング剤などで官能性基を導入してあるものが挙げられる。さらに、ろ紙、ビーズ、試験容器の内壁、例えば試験管、タイタープレート、タイターウェル、ガラスセル、合成樹脂製セルなどの合成材料からなるセル、ガラス棒、合成材料からなる棒、末端を太くしたりあるいは細くしたりした棒、末端に丸い突起をつけたりあるいは偏平な突起をつけた棒、薄板状にした棒などの固体物質 (物体) の表面などが挙げられる。

【0018】これら担体へは、抗体を結合させることができ、好ましくは本発明で得られる P I V K A-2 に対し特異的に結合するモノクローナル抗体を結合させることができる。担体とこれら抗原抗体反応に関与するものとの結合は、吸着などの物理的な手法、あるいは縮合剤などを用いたり、活性化されたものなどを用いたりする化学的な方法、さらには相互の化学的な結合反応を利用した手法などにより行うことができる。本発明においては、基質など信号の形成に 4-ヒドロキシフェニル酢酸、1, 2-フェニレンジアミン、テトラメチルベンジジンなどが西洋ワサビ・ペルオキシダーゼ (P O D) と共に、ウンベリフェリルガラクトシド、ニトロフェニル

ガラクトシドなどが β -D-ガラクトシダーゼ、グルコース-6-リン酸・デヒドロゲナーゼなどの酵素試薬と共に利用でき、ヒドロキノン、ヒドロキシベンゾキノン、ヒドロキシアントラキノンなどのキノール化合物、リポ酸、グルタチオンなどのチオール化合物、フェノール誘導体、フェロセン誘導体などを酵素などの働きで形成しうるものが使用できる。蛍光物質あるいは化学ルミネッセンス化合物としては、フルオレセインイソチシアネート、例えばローダミンBイソチオシアネート、テトラメチルローダミンイソチオシアネートなどのローダミン誘導体、ダンシルクロリド、ダンシルフルオリド、フルオレスカミン、フィコビリプロテイン、アクリジニウム塩、ルミフェリン、ルシフェラーゼ、エクオリンなどのルミノール、イミダゾール、シュウ酸エステル、希土類キレート化合物、クマリン誘導体などが挙げられる。

【0019】本発明の測定法によれば、測定すべき物質を酵素などで標識したモノクローナル抗体などの標識抗体試薬と、担体に結合された抗体とを順次反応させることができるし、同時に反応させることもできる。試薬を加える順序は選ばれた担体系の型により異なる。感作されたプラスチックなどのビーズを用いた場合には、酵素などで標識したモノクローナル抗体などの標識抗体試薬を測定すべき物質を含む検体試料と共に最初適当な試験管中に一緒に入れ、その後該感作されたプラスチックなどのビーズを加えることにより測定を行うことができる。測定にあたっては至適pH、例えばpH約4~9に保つように適当な緩衝液系中で行うことができる。特に適切な緩衝剤としては、例えばアセテート緩衝剤、クエン酸塩緩衝剤、フォスフェート緩衝剤、トリス緩衝剤、トリエタノールアミン緩衝剤、ボレート緩衝剤、グリシン緩衝剤、炭酸塩緩衝剤、トリス塩酸緩衝剤などが挙げられる。緩衝剤は互いに任意の割合で混合して用いることができる。抗体抗原反応は約0℃~60℃の間の温度で行うことが好ましい。

【0020】酵素などで標識されたモノクローナル抗体などの抗体試薬及び担体に結合せしめられた抗体試薬、さらには測定すべき物質のインキュベーション処理は、平衡に達するまで行うことができるが、抗体抗原反応の平衡が達成されるよりもずっと早い時点で固相と液相とを分離して限定されたインキュベーション処理の後に反応を止めることができ、液相又は固相のいずれかにおける酵素などの標識の存在の程度を測ることができる。測定操作は、自動化された測定装置を用いて行うことが可能であり、ルミネッセンス・ディテクター、ホト・ディテクターなどを使用して基質が酵素の作用で変換されて生ずる表示シグナルを検知して測定することもできる。抗体抗原反応においては、それぞれ用いられる試薬、測定すべき物質、さらには酵素などの標識を安定化したり、抗体抗原反応自体を安定化するように適切な手段を講ず

ることができる。さらに、非特異的な反応を除去し、阻害的に働く影響を減らしたり、あるいは測定反応を活性化したりするため、タンパク質、安定化剤、界面活性化剤、キレート化剤などをインキュベーション溶液中に加えることもできる。キレート化剤としては、エチレンジアミン四酢酸塩(EDTA)がより好ましい。当該分野で普通に採用されていたりあるいは当業者に知られた非特異的結合反応を防ぐためのブロッキング処理を施してもよく、例えば、哺乳動物などの正常血清タンパク質、アルブミン、スキムミルク、乳発酵物質、コラーゲン、ゼラチンなどで処理することができる。非特異的結合反応を防ぐ目的である限り、それらの方法は特に限定されず用いることが出来る。本発明の測定方法で測定される試料としては、あらゆる形態の溶液やコロイド溶液、非流体試料などが使用しうるが、好ましくは生物由来の試料、例えば血液、血漿、関節液、脳脊髄液、唾液、羊水、尿、その他の体液、細胞培養液、組織培養液、組織ホモジュネート、生検試料、組織、細胞などが挙げられる。例えば血液、血漿、肝細胞培養液、肝組織培養液、肝組織、肝組織ホモジュネート、肝臓生検試料などが挙げられる。

【0021】本発明に従えば、上記測定方法に直接使用する試薬が提供される。こうした試薬は、少なくとも2種のPIVKA-2に対するモノクローナル抗体を用いて測定を行うに適した形態の試薬セットであることができる。この試薬セットに含まれる代表的な試薬としては、少なくとも2種のPIVKA-2に対するモノクローナル抗体が固相化されている固相、例えば(i)プロトロンビンとは反応せず且つPIVKA-2とのみ反応するモノクローナル抗体及び(ii)プロトロンビンと反応し且つPIVKA-2とも反応するモノクローナル抗体の双方がコートされているプラスチック製のウェルを含むことを特徴としたものが挙げられる。試薬セットにはこの他、標準抗原、標識された抗プロトロンビン抗体などのような酵素標識された抗体(第二抗体)及び基質、希釈液、溶解液、反応停止剤、緩衝液などが含まれていて良い。これら構成要素は任意に測定が便利に行えるように組み合わせられてよい。

【0022】

【実施例】以下実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されることなく、当業者にとっては容易に各種の実施の形態が明らかであろうし、それらもまた本発明の特徴とするものを使用するなら本発明の範囲の内にあることは理解されるべきである。

実施例1 (試薬の調整及び方法)

1) PIVKA-2の精製

PIVKA-2及びAFPの産生株である、ヒト肝癌由来細胞PLC/PRL/5(Alexander)を用いて培養上清中よりPIVKA-2を得る。培養条件

は、Alexanderを牛胎児血清(FCS)存在下で培養し、コンフルエント(confluent)な条件下でFCS Freeに変えた条件下、ビタミンK拮抗物質であるWafarin(0.08mg/ml)を投与し、PIVKA-2の産生を促した。培養上清中PIVKA-2濃度は4.2Au/mlで、AFP濃度は200ng/mlであった。ワーファリンを添加することで産生量が増え、濃度が20μg/ml以上、そして培養日数が6~8日の条件でプラトーとなる結果が得られた。プロトロンビンプレカーサーからプロトロンビンへの代謝阻害を完全に行う目的から、ワーファリンの濃度は80μg/mlとした。上記のようにして得られた培養上清を集めて、以下のように精製を行った。まず、DE-52またはCM-52 Celluloseを用いたイオン交換クロマトグラフィーにより粗精製を行った。平衡緩衝液のpH(3.0~7.0)に対してそれぞれ0.1~0.3M NaClのグラジエントの溶出条件の中でPIVKA-2と夾雑タンパクの分離が可能となる条件を設定して精製を行った。pH5.0の緩衝液でPIVKA-2とプロトロンビンとが良好に分離することが認められた。さらに、プロトロンビンとPIVKA-2のC端側の共通部分に対するポリクローナル抗体を用いたアフィニティ・クロマトグラフィーにかけ精製を行った。アフィニティカラムは、CN-Br活性化Sephrose 4B(Pharmacia)を使用し、膨潤ゲル1gあたり18.5mgのリガンドを通常の方法でカップリングさせたものをアフィニティ・クロマトグラフィーの担体とした。カラムの平衡化緩衝液は0.2M PB、0.2M NaCl pH6.5で、溶出は5M塩酸グアニジンを用いた。上記の精製方法で得られたPIVKA-2は、5%アクリルアミド電気泳動でほぼ単一のバンドとして得られた。

【0023】2) 抗PIVKA-2モノクローナル抗体の作製及び精製

上記1)で精製したPIVKA-2(0.06mg/0.3ml)を同容量の完全・フロイント・アジュバント(Complete Freund Adjuvant)と共にBALB/Cマウス(雌、6week)の皮下へ投与し、2週間後最初と同量の抗原を不完全・フロイント・アジュバント(incomplete Freund Adjuvant)と共に投与する。さらに、同量の抗原で追加免疫(2週間後)を行った後、2週間してさらに抗原0.03mgを腹腔Boosterとして投与し、5日後に脾臓細胞を採集し細胞融合を行った。脾細胞 1.8×10^8 個と、ミエローマ細胞(PAI) 6×10^7 個とを50%のポリエチレングリコールを用いて融合させた。融合は血清フリーRPMI培地に懸濁した両細胞を1500rpmで遠心し、上清をアスピレーターで除去した後ポリエチレングリコール液1mlを静かに加え、1分間さらに静かに攪拌する。血清

フリーRPMI培地をゆっくり加えた後5分間1500rpmで遠心し、上清をアスピレーターで除去し、HAT培地(血清フリーRPMI培地にヒポキサンチン(100μM)、アミノプテリン(0.4μM)およびチミジン(16μM)を加えたもの)を加え、96穴プレートで、細胞濃度として 5×10^5 個/ウェルに調整し(プレート5.5枚)、約10日間培養する。2、3、5、8日目に培地の半分(約0.1ml)を新しいHAT培地で置き換え、10日目に培地の半分を新しいHT培地(アミノプテリン不含HAT培地)で置き換えた。ハイブリドーマの生育が肉眼にて認められた全ウェルについてスクリーニングを行った。スクリーニングの方法は、以下の3法(EIA)で行い、クローンを選択した。

【0024】① IgG産生クローンのチェック法/Anti mouse IgG固相-培養上清-POD Anti mouse IgG

② PIVKA-2産生クローンのチェック法/PIVKA-2精製抗原固相-培養上清-POD Anti mouse IgG

③ Prothronbin産生クローンのチェック法/Prothronbin抗原固相-培養上清-POD Anti mouse IgG

各スクリーニングでは、ポリスチレン製96穴プレートを抗原でそれぞれでコートし、次に洗浄用PBS(0.05%Tween 20含有)を用いて洗浄して未吸着のペプチドを除いた。さらに各ウェルの未コート部分を1%BSAでブロックした。この各ウェルにハイブリドーマの生育が確認されたウェルの上清0.1mlを添加し、室温で約1時間静置した。2次抗体として西洋わさびペルオキシダーゼ(POD)標識ヤギ抗マウス免疫グロブリン(Cappel Lab.)を加え、さらに室温で約1時間静置した。次に基質である過酸化水素とo-フェニレンジアミンを加え、発色の程度をマイクロプレート用吸光度測定機(MRP-A4、東ソー)を用いて492nmの吸光度で測定した。この3法のうち、PIVKA-2とは反応するがProthronbinとは反応(③法)しないクローンを選択していった。そして、限界希釈法により3回のクローニングを行い、2種類の抗PIVKA-2抗体産生株(2G4、1C9)を樹立した。以下この細胞株により産生されるモノクローン抗体を2G4、1C9と呼称する。上記PIVKA-2抗体産生ハイブリドーマ細胞株2G4は、工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM P-15070として寄託保存されている。またPIVKA-2抗体産生ハイブリドーマ細胞株1C9は、工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM P-15069として寄託保存されている。各抗体の免疫グロブリン・クラスはIgGに属し、又そのサブクラスはG1であった。これらは、mouse monoclonal

antibody isotyping Kit (Amersham社)で確認を行った。樹立しハイブリドーマの凍結保存は、10%FCS含RPMI1640培地を用いて培養し対数増殖の細胞を $4 \times 10^6 \sim 10^7$ cell/mの数で凍結保存する。凍結保存液としては20%FCS、10%DMSO含RPMI-1640培地を用いた。得られたハイブリドーマより抗体の精製を行うには、まず2G4及び1C9 cellを培養して増やし、FCS Freeの条件下で 3×10^6 個 $\sim 1 \times 10^7$ 個/mlを予め1週間前にプリスタンで腹腔内投与したマウス(BALB/c系、♀、6週齢)の腹腔へ投与する。約7~10日後腹水を採取し、40%硫酸で2度塩析し、その沈殿物を凍結保存した。腹水からの精製は、Protein A cellofine chromatographyにより行った。subclassがG1の本抗体は、pH8.5の緩衝液(50mM TrisHCl、150mM NaCl)で吸着させpH5.0(100mM Citric、150mM NaCl)の穏やかな条件下で溶出させ精製抗体を得る。20mM PBSで透析後、0.01%NaN3を添加して用いる。

【0025】3) ペルオキシダーゼ標識ヒトプロトロンビンIgGの作製
DAKO社のヒトプロトロンビンをウサギに免疫し、得られた血清をQ-Sepharose chromatography(50mM TrisHCl、pH8.0)にかけ0~0.2M NaCl GradientでIgG分画を溶出させる。得られたIgGをヒトプロトロンビン affinity chromatographyを用いて抗ヒトプロトロンビン・ウサギIgGの特異抗体を精製した。アフィニティ・カラムには、ホルミルセルロフアインを使用しゲル1gあたり1.4mgのプロトロンビンをカップリングさせる。平衡化緩衝液は0.1M PB(pH7.0)で、溶出緩衝液は0.1クエン酸緩衝液を用いた。得られた特異抗体の割合はTotal IgGの3~5%であった。以上の操作により得られた抗ヒトプロトロンビンIgG 2.5mgと西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP) 2.0mgをマレイミド法にて標識を行った。2mg/0.3mlのHRP(0.1mol/l、pH7.0)にN-(ε-マレイミドカプロイルオキシ)コハク酸イミド(EMCS) 0.3mg/30μlを加え、30℃で60分間攪拌し、生成物の緩衝液を置換処理する。一方2.5mg/0.25mlのIgG(0.1mol/l、リン酸塩緩衝液、pH7.5)にAMSAの0.12mg/2μlを加え、室温で30分間攪拌し、次いで0.1mol/lのEDTA/2Naの20μl、1mol/lのTris-HCl(pH7.0) 50μl及び1mol/lのヒドロキシルアミン塩酸50μlを加え、30℃で5分間攪拌し、生成物の緩衝液を置換処理する。両者

を等量混合し、4℃で一晩静置した後、ゲルろ過して標識物を得た。得られた標識体のHRP/IgG(モル比)は1.5~3.0の範囲であった。またwellあたりのIgG濃度は1.4~3.0ngであった。反応系での使用希釈倍数は約1~2万倍である。他に、DAKO社のヒトプロトロンビンマウスに免疫し、細胞融合を行い抗ヒトプロトロンビンモノクローナル抗体を得た(免疫方法及び融合方法は、PIVKA-2に準ずる)。上記3)と同様な方法でペルオキシダーゼ標識を行い、標識抗体を得る。検体を測定した結果ではほぼ同様な有効性が認められた。モノクローナル抗体を用いると、特異抗体に精製するステップが省けるという利点がある。同様に1C9抗体についても標識抗体の作製を行った。

【0026】実施例2 (ELISAの方法及び測定条件)

1) イムノプレートの選択

ELISAのプレートの選択をするにあたり、抗体の固相吸着性の高い、かつ非特異反応が低いプレートの選択することを基準にイムノプレートの選択検討を行った。固相緩衝液には、10mM Tris-HCl 0.1M NaCl(pH7.0)を用い、10μg/mlに調整した2G4抗体0.1ml加え、4℃で一晩固相化を行う。洗浄液(10mPBS、0.05%Tween-20)で3回洗浄後、10%スキムミルクを0.2ml加え、室温で2hr ブロッキング(Blockin)を行う。洗浄後、PIVKA-2 標準品(St) 0.1mlを加え、室温で2hr 反応させる。ペルオキシダーゼ標識抗ヒトプロトロンビンIgG(0.1M Tris HCl、0.075M NaCl、0.2% Tween-20、5%NRS、50%Block Ace、pH7.0)を0.1ml加え、室温1hr 反応後、基質液0.1ml加え、30min後に2Nの硫酸で反応を止める。比色は450/650nmのフィルターで測定する。この結果、抗体の固相吸着性の高い、かつ非特異反応が低いプレートが選択できた。このようなプレートとしては、Labosystem社製のプレート、Corning社製のプレート、Nunc社製のMaxsorpプレートなどが挙げられる。

2) 反応緩衝液の選択

ELISAにおいては、サンプルである血清を直接反応させると、血清成分中のある物質の影響で固相抗体への反応阻害が生ずる場合があり、PIVKA-2の系においてもこの現象が認められる。これを減少させる方法の1つとして、サンプルの希釈がある。この希釈効果は非特異反応も抑える結果をもたらすが、測定系の感度に影響を与えないものとする必要がある。そこで希釈緩衝液及びその成分などの条件について検討をおこなった。基本緩衝液として、25mM 緩衝液(Buffer)/0.075M NaCl/0.1%BSA/0.01%

Tween-20を用いて試験した。その結果、緩衝液としては、Tris-HCl緩衝液(pH7.0及びその近傍)を用いるのが適当と判断された。反応性、安定性の観点から選択できることが確認された。また、反応性が高く、血清成分による阻害が少なく、かつ非特異反応の抑制効果のある条件を選択することができることが確認された。

3) 反応時間の検討

	反応温度(室温)		
反応時間	1 hr	2 hr	2 hr
第1反応	1 hr	1 hr	1 hr
第2反応	0.5 hr	0.5 hr	1 hr
第3反応			

検討の結果、第1反応は2時間、第2反応も2時間、そして第3反応1時間が適した条件と判断された。

4) 固相濃度及び固相時間

抗体固相濃度は、反応性がプラトーに達する条件で抗体濃度の設定をした。2G4抗体のみの固相化を、変性抗体あるいは未変性抗体と比較した。また、2G4抗体と1C9抗体を混合した場合でも同様な濃度で固相化がされるのかを確認した。抗体固相濃度は、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ で十分と判断されたが、非特異的反応を少なくするため $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ が適当と判断された。また固相化は、混合抗体の場合4℃で1日の処理で十分な結果が得られていたが、2G4抗体単独では4℃で1日の処理では十分でない場合もあることが認められた。

5) 酵素基質液の調整

テトラメチルベンチジン(TMB) 0.17gを、DM SO 9.9mlに溶解後、飽和EDTA-2Na液 0.8mlを加えた第1試薬と、0.1M酢酸ナトリウム、10mM EDTA-2Naと10%ジメチルホルムアミドを1Mクエン酸でpH5.0に調整し、1リットルにメスアップする(第2試薬)。第2試薬に第1試薬を加え、室温に一晩放置してから使用する。使用時には、基質液の色は無色である。反応停止液として2Nの硫酸を調整して用いた。

【0027】実施例3 (モノクローナル抗体(2G4/1C9)の特性の確認)

1) モノクローナル抗体2G4の特性(変性処理抗体の※

* サンドイッチ法は、第1反応(1次抗体とサンプルの反応)と、第2反応(1次抗体と反応した抗原と標識2次抗体との反応)そして第3反応(標識2次抗体と基質との反応)から成る。どのステップの反応時間が、測定結果に及ぼす影響として大きいのかを、第1反応を室温とした場合と、4℃の場合で比較を行った。反応条件は以下に示す。

反応温度 (4℃)				
ON	ON	ON	ON	ON
1 hr	1 hr	2 hr	3 hr	4 hr
0.5hr	1 hr	1 hr	1 hr	1 hr

※特性)

2G4抗体の精製はProtein Gを用いた方法で行なう。この方法は溶出緩衝液にグリシン/HCl(pH2.2)緩衝液を使用するが、抗体に対する変性があると認められる方法である。次に、Protein Aによる精製方法に変え、溶出条件をクエン酸緩衝液(pH5.0)にすることで、精製IgGの純度をより上げた。ところが、精製抗体(Protein GとProtein A)をそれぞれ固相としELISAの系に用いたところ、Protein Aによる精製抗体の反応性は低い結果となった。そこで、Protein Aで精製した抗体を変性処理した場合、その反応性が向上するか否かを検討した。検討は2G4抗体を用いて行った。方法は以下の2通りである。

(処理1) 0.5mlの抗体と0.5mlの0.5MグリシンHCl(pH2.2)液を室温で30分間反応させた後0.5mlの中和緩衝液を加え、得られた処理抗体を固相化して反応に用いた。

(処理2) 0.1mlの抗体と6M-グアニジンHCl液の0.1ml(×2)/0.4(×5)/0.9(×10)のものを室温で60分間反応させた後透析(20mM PBS)を行い固相化して反応に用いた。

結果を表1に示す。

【0028】

【表1】

表1

固相濃度 PIVKA-2 (Au/ml)	(-) 処理抗体		
	12.5 $\mu\text{g/ml}$	25 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$
0	0.032	0.019	0.015
0.1	0.031	0.019	0.019
0.5	0.043	0.033	0.038
2	0.08	0.072	0.114
8	0.236	0.24	0.434

表1 (続き)

固相濃度 PIVKA-2 (Au/ml)	0.5Mグリシン処理 (処理1)	
	12.5 $\mu\text{g/ml}$	25 $\mu\text{g/ml}$
0	0.057	0.061
0.1	0.056	0.077
0.5	0.11	0.16
2	0.28	0.47
8	0.824	1.367

表1 (続き)

固相濃度 PIVKA-2 (Au/ml)	6Mグアニジン処理 (処理2)		
	12.5 $\mu\text{g/ml}$	25 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$
0	0.059	0.057	0.047
0.1	0.083	0.083	0.078
0.5	0.205	0.205	0.203
2	0.619	0.619	0.6
8	1.724	1.724	1.752

【0029】精製抗体の変性処理効果を調べた結果、2G4抗体においては未処理に比較し変性処理により、抗体の反応性を約10倍程度上昇させることができることが判明した。固相濃度25 $\mu\text{g/ml}$ で比較すると、変性試薬6Mグアニジン塩酸の効果が最も高かった。反応性の上昇する要因としてはIgGのFc部分の変性効果が、固相への吸着能を高めているのではないかということが示唆される。

【0030】2) 認識部位の近い2種類の抗体(2G4、1C9)を混合し固相化した場合の特異性1G9抗体を固相としたELISA系では、正常プロトロンビンにも反応するが、一方で末期の肝癌を検知している結果が得られている。2G4抗体は正常プロトロンビンとはほとんど反応せず、PIVKA-2と反応しているという特性が得られていることから、両者を混合して用いた場合について検討した。ところで両者を混合して用いた場合には、正常プロトロンビンとの反応性が表面化してPIVKA-2の特異性が下がることが予測されるが、そうした結果になるか否かも検討した。混合の方法は、2G4抗体または1C9抗体を各40 $\mu\text{g/ml}$ に調整し、以下の混合比で固相化を行った。

(2G4抗体/1C9抗体) = (5/0)、(4/1)、(2/1)、(1/1)、(1/2)、(1/

4)、(0/5)

固相化後のELISAの方法は、いままで述べた方法と同様である。上記(2)で精製した2G4及び1C9抗体それぞれ単独あるいは両者を混合した抗体を固相に用いたELISAの系において、PIVKA-2あるいはプロトロンビンに対する反応性を調べる。マイクロプレート(Labosystem Breakable, F8)を使用し、固相緩衝液に10mM TrisHCl、0.1M NaCl (pH7.0)を用い、50 $\mu\text{g/ml}$ に調整した2G4あるいは1C9抗体を0.1ml加え、4℃一晩固相化を行う。洗浄液(10mM PBS、0.05% Tween-20)で3回洗浄後、10%スキムミルク0.2mlを加え室温に2hr放置Blockingを行う。さらに3回洗浄後、PIVKA-2 Standard (ワーファリン投与患者血漿:市販品)あるいはプロトロンビンStandard (市販品)を0.1ml加え、室温で2hr反応させる。洗浄後、上記実施例1の3)で得られたペルオキシダーゼ標識抗ヒトプロトロンビンIgG (0.1M Tris-HCl、0.1M NaCl、0.2% Tween-20、5% NRS、50% Block Ace)を0.1ml加え、室温1hr反応後、基質液(TMB) 0.1mlを加え1hr後に2N-H₂SO₄

30

40

50

0.05ml 添加し反応を止め、450/650nmの *【0031】
 フィルターで比色を行う。結果を表2、表3、表4、表 【表2】
 5及び表6に示す。

*

表2

抗体の混合比と反応性の関係

各抗体の混合率 2G4抗体 1C9抗体		PIVKA-2		Standard	
		0Au/ml	0.1Au/ml	0.5Au/ml	2.0Au/ml
100 %	0%	0.054	0.052	0.097	0.22
80 %	20%	0.092	0.33	0.907	1.623
60 %	40%	0.101	0.401	1.099	1.841
50 %	50%	0.11	0.416	1.167	1.887
40 %	60%	0.116	0.466	1.224	1.883
20 %	80%	0.111	0.477	1.284	1.869
0 %	100%	0.052	0.05	0.053	0.073

【0032】各々、一定濃度の抗体を混合の比率を変え、固相化した場合のELISAの結果では、2G4抗体のみの固相に比べ、混合した場合の反応性は約10倍前後上昇している。1C9抗体のみでは反応性はほとんど認められなかった。混合比による反応性の差異はそれほどない。さらに、1C9抗体のプロトロンビンに対す※20

※る反応性をみるため、まず、混合抗体にした場合のプロトロンビンとの反応性を緩衝液系、ついで血清系で調べた。結果は表3、表4、表5及び表6に示す。

【0033】

【表3】

表3

抗体の混合比と反応性の関係

PIVKA-2 Standard	2G4/1C9 抗体混合比				
	1/1	1/4	1/9	4/1	9/1
0Au/ml	0.134	0.105	0.118	0.119	0.103
0.015Au/ml	0.156	0.13	0.14	0.147	0.126
0.03 Au/ml	0.189	0.163	0.161	0.156	0.137
0.06 Au/ml	0.254	0.223	0.228	0.214	0.177
0.125Au/ml	0.38	0.346	0.343	0.307	0.253
0.25 Au/ml	0.63	0.596	0.593	0.5	0.413
0.5 Au/ml	1.112	0.962	0.96	0.819	0.677
1.0 Au/ml	1.74	1.269	1.296	1.308	1.005

【0034】

【表4】

表4

抗体の混合比と反応性の関係

プロトロンビン μg/ml	2G4/1C9 抗体混合比				
	1/1	1/4	1/9	4/1	9/1
0	0.073	0.063	0.067	0.075	0.069
1.56	0.072	0.069	0.076	0.073	0.066
3.12	0.077	0.079	0.088	0.098	0.071
6.25	0.088	0.102	0.129	0.08	0.072
12.5	0.106	0.182	0.241	0.096	0.087
25	0.189	0.304	0.456	0.118	0.117
50	0.353	0.572	0.906	0.216	0.164
100	0.694	0.901	1.409	0.315	0.278

緩衝液添加の系では、1C9抗体の割合が高くなるとプロトロンビンとの反応性が上昇している。そこで、血清添加の系についても、検討を行った。

★【0035】

【表5】

★

表 5

抗体の混合比と反応性の関係						
抗体 被覆量 0.01mg/ml 2G4 1C9			PIVKA-2 Standard Au/ml			
			0	0.1	0.5	2
1	100	0	0.131	0.124	0.2	0.526
2	100	1	0.134	0.151	0.27	0.673
3	100	2	0.134	0.162	0.34	0.859
4	100	3	0.14	0.182	0.417	0.963
5	100	4	0.14	0.194	0.461	1.1
6	100	5	0.143	0.207	0.497	1.196
7	100	6	0.146	0.219	0.53	1.306
8	100	7	0.149	0.237	0.489	1.452
9	100	8	0.151	0.236	0.61	1.454
10	100	9	0.159	0.246	0.653	1.533
11	100	10	0.148	0.243	0.651	1.497
12	100	20	0.158	0.29	0.842	1.837
13	0	100	0.09	0.075	0.082	0.084
14	1	100	0.085	0.097	0.16	0.318
15	2	100	0.092	0.109	0.215	0.509
16	3	100	0.1	0.128	0.275	0.686
17	4	100	0.09	0.137	0.341	0.778
18	5	100	0.1	0.148	0.409	0.911
19	6	100	0.1	0.15	0.406	1.011
20	7	100	0.102	0.164	0.462	1.112
21	8	100	0.106	0.176	0.488	1.242
22	9	100	0.11	0.189	0.518	1.306
23	10	100	0.107	0.188	0.566	1.292
24	20	100	0.122	0.237	0.617	1.337
25	50	50	0.144	0.307	0.909	2.341

【0036】

【表 6】

表6

抗体 被覆量 0.01mg/ml 2G4 1C9			Prothrombin Standard mg/ml 1 10 100		
1	100	0	0.123	0.124	0.119
2	100	1	0.125	0.12	0.118
3	100	2	0.132	0.129	0.124
4	100	3	0.127	0.129	0.128
5	100	4	0.133	0.128	0.127
6	100	5	0.14	0.133	0.137
7	100	6	0.138	0.142	0.132
8	100	7	0.142	0.145	0.141
9	100	8	0.142	0.144	0.137
10	100	9	0.146	0.139	0.131
11	100	10	0.142	0.139	0.136
12	100	20	0.151	0.153	0.143
13	0	100	0.078	0.078	0.078
14	1	100	0.078	0.08	0.088
15	2	100	0.082	0.085	0.089
16	3	100	0.089	0.086	0.094
17	4	100	0.09	0.086	0.096
18	5	100	0.096	0.091	0.104
19	6	100	0.093	0.097	0.102
20	7	100	0.101	0.101	0.109
21	8	100	0.096	0.105	0.108
22	9	100	0.104	0.106	0.107
23	10	100	0.104	0.107	0.105
24	20	100	0.12	0.124	0.121
25	50	50	0.143	0.134	0.134

【0037】混合抗体として用いた場合は、血清の添加でプロトロンビンの反応性は全く抑制される結果が得られた。さらに、この方法の妥当性を確認するため検体の測定を行い、2G4抗体のみで用いた場合とで比較データをまとめた。用いた固相抗体の条件は、2G4抗体のみの系、2G4/1C9 (1/1) 混合抗体系について行った。固相抗体の違いによる測定値への影響は認められなかった。認識部位の近い抗体を混和して用いることで、飛躍的に反応性があがり、測定系の感度上昇の一層の改善を図ることができることが観察された。2種類の抗体を混合して用いることで、反応性が上昇するだけでなく、一方の特異性を極立たせる結果を導いている。このようになる要因を説明するのは難しいが、混合することで固相に吸着した際の立体構造の変化から、抗体の affinity が増すのではないかと推測される。

【0038】3) 2G4抗体のPIVKA-2に対する特異性を、2G4抗体に対する inhibition 試験で確認

PIVKA-2抗原 (8/4/2/1/0.5/0Au/ml) と2G4抗体 (40/20/10/5/2.5/0μg/ml) を混合し、直ぐに2G4固相化プレートに加え、一晚 (4℃) 反応させる。以下は通常のEIAに準じて行った。すなわち、POD標識抗プロトロンビン抗体100μg/mlを添加し、4℃で1時間反応後基質200μg/mlを添加し、室温で30分間処理し、反応停止液50μg/mlを添加した。この結果よ

り、2G4抗体のPIVKA-2に対する特異性、そしてPIVKA-2抗原における2G4抗体の抑制試験から、本抗体の affinity の強さを求めた。

【0039】実施例4 (ELISA系における非特異反応)

1) 自己抗体 (RAPA) の検体を用いての非特異反応 ELISAの系において問題となるのは非特異反応の有無である。この原因については色々考えられる。固相プレートへの非特異的吸着に対する標識抗体の反応、あるいは自己抗体に対する非特異的反応がある。そして、これらは緩衝液成分を選択することでかなり改善が可能となったり、全く不可能となったりする。本発明のPIVKA-2のELISA系における非特異反応について検討した。測定は自己抗体の検査項目であるRAPAの検体を用いて行った。検出された検体については市販キットを用いて再度測定を行い確認することとした。方法は、固相化プレート (乾燥後、バック処理保存) に緩衝液0.1mlと、サンプル0.1mlを加え4℃で一晩反応させる。その後の操作は通常に従って行った。その結果、RAPA測定値が高いサンプルでPIVKA-2陽性となる例があったが、これは市販キットでも同様の結果であり、自己抗体の測定結果との相関性は認められなかった。

【0040】2) 非特異反応抑制

PIVKA-2陰性検体を56℃で30分間放置し非動化し、これを人為的に作製した非特異サンプルとして用

いて抑制効果の指標とした。方法は通常通りに行い、測定系において緩衝液成分が及ぼす非特異反応の抑制効果を調べた。

① マウスIgGあるいはウサギ血清の緩衝液への添加の有無；基本緩衝液を0.01M Tris HCl/*

一次反応	反応緩衝液	(+)	(+)	(-)
二次反応	標識抗体希釈緩衝液	(+)	(-)	(+)

測定の結果、一次反応へのウサギ血清の添加は一定以上になると、顕著に非特異反応を示している結果が得られたが、二次反応へのウサギ血清の添加は大過剰であっても抑制されていることが判明した。一方マウスIgGの添加は二次反応で一定以上になると、全体の反応そのものが抑制される結果となり、二次反応系への添加がより※

NaCl (M)	0.075	0.15	0.3	0.6
Tween-20 (%)	0.01	0.2	0.5	1.0

結果、NaClは0.75M以上になると反応性がほぼ1/2に低下し非特異反応もそれに比例した結果となった。Tween-20は0.2%以上になるとマウスIgG添加の系では反応性が低下気味となるが、非特異反応はあまり変化はみられなかった。これらの結果から、非特異反応を抑えるための基本緩衝液への添加物として、0.01% mIgGあるいはウサギ血清に、0.075M NaClそして0.2% Tween-20を添加することが適切と判断される。

【0042】実施例5 (検体の測定)

1) PIVKA-2標準品であるワーファリン投与患者血漿を10倍に希釈し8Au/mlとしたものを倍々希釈したものを使用し標準曲線を作製した。モノクローナル抗体固相化プレートは、2G4/1C9混合抗体を使用し、HRP標識ウサギポリクローナル抗体を標識抗プロトロンビン抗体として用いた。0.2μg/mlの混合抗体0.2mlをイムノプレート(ラボシステム・プレーカブル・プレート)(0.2ml/well)に加え、4℃で一晩インキュベーション処理し、3回洗浄後50%ブロックエース液0.25mlで処理し室温で2時間インキュベーション処理する。次に3回洗浄後2%サッカロース及び1%BSAからなる二次コーティング液0.25mlを加え、室温で2時間放置し、デカンテーション処理を30分間行った後室温で一晩乾燥し、固相化プレートを得る。測定は測定用緩衝液0.1ml及☆

* 0.075M NaCl/0.01% Tween-20とし、一次反応系の緩衝液に加える条件、そして2次反応系の標識抗体希釈緩衝液に加える条件の2系列で検討を行った。

添加の有無

※有効と判断された。

【0041】② ①で選択した条件に、NaClとTween-20を加え、添加濃度について検討を加えた。基本緩衝液に0.01% mIgG、0.1% mIgG、5.0% NRSを加え、下記の濃度NaClまたはTween-20をくわえる。

☆び検体試料0.1mlを固相化プレートに加え、4℃で一晩インキュベーション処理し、4回洗浄後HRP標識抗プロトロンビン抗体0.2mlを添加し、室温で2時間インキュベーション処理し、5回洗浄後基質液(TM B)0.2mlを添加し、室温で1時間インキュベーション処理し、反応停止液0.05mlを加え、比色(540/650nm)する。同様に肝癌由来腹水についても測定した。

【0043】

【表7】

表7

PIVKA-2標準品 Au/ml	測定値
0.03	0.04
0.06	0.07
0.125	0.135
0.25	0.26
0.5	0.5
1.0	1

【0044】

【表8】

表 8

肝癌由来腹水 希釈倍率	測定値	PIVKA-2換算 Au/ml
× 4	0. 9 5	3. 8
× 8	0. 4 5	3. 6
× 1 6	0. 2 2	3. 5
× 3 2	0. 1	3. 2
× 6 4	0. 0 5	3. 5
× 1 2 8	0. 0 3	3. 6
× 2 5 6	0. 0 2	4. 4

【0045】同様に、肝細胞癌を含む臨床127例についても、本発明の混合抗体を使用した測定系を用いてPIVKA-2を測定した。 α フェトプロテイン (AFP) 及び他の肝疾患関連項目である、GOT、GPT、*

* 総ビリルビン、アルブミンについても結果をまとめて表9～表15に示した。

【0046】

【表9】

Sample NO	採種日	本発明測定 キット AU/mL	AFP ng/mL	診断名	潜在、分布	PV or HV	GOT	GPT	T.Bili	Alb	その他
5347	94.3.18	0.04	140	HCC(C)	1.48mm(US)S4		88	73	1.4	2.3	3/4 TAB
5349		0.03>	36	HCC(C)	S5(9mm)		94	79	0.9	3.1	
5359		0.03>	82	HCC(C)	S5(11), S6(11), S8		53	51	0.8	3.1	
5398		0.03>	9.6	HCC	両側SUL		68	68	0.4	3.7	
5357	94.3.18	1.47	1100								
4477		0.03>	19.8	LC(C)	生検はnegative		130	83	1.7	2.9	
4533		0.03>	2.2	HCC(B)	Angion再発(-)		22	21	1	3	
5337		0.03>	280	HCC(C)	S4, 6, 8にHCC		75	55	1.2	2.5	Stage 4-A
5351	94.3.17	0.15	116	HCC(C)	両側に多発		205	176	2.6	2.9	
4561		0.03>	5600	HCC	両側に多発		175	108	1.6	1.9	1/18 TAB
6107	94.2.21	0.32	142	HCC(B)	両側に多発		41	32	0.5	3.8	
4563	93.1.29	0.03>	4600	HCC(C)	肝に再発なし		24	13	0.5	3.6	食道癌、咽頭癌
4499		0.03>	280	HCC(C)	両側に多発性、小腫瘍		158	140	0.8	3.1	12/21 TAB 総胆管腫瘍
5363		0.03>	740	HCC(C)	両側に多発		72	69	0.9	3.2	
4479		0.03>	5.4	CAH(C)			40	49	0.7	4.1	IPN 治療
4501	93.1.5	1.28	142	HCC(C)	両側に多発		51	27	0.5	3.1	Stage 2
4583	93.2.2	4.9	1700	HCC(C)	S7(70mm)		66	101	1.8	3.1	
4590		0.06>	340	HCC(C)	S6(20), S8		125	168	2.1	2.8	TAB前
4607		0.06>	290				67	122	1.5	3	TAB後

【0047】

【表10】

Sample NO	採 種 日	本発明用 キット Au/ml	AFP ng/ml	診断名	病 在、 分 布	PV or HV	GOT	GPT	T.Bili	A1b	その他
4631		0.06>	1100	HCC(B)	S4, 7のSUL		64	87	0.8	3.6	
4633	93. 2. 19	0.49	5000<	HCC(C)	両葉に多発性のSUL		133	59	1.6	2.5	
4644		0.06>	25	HCC(C)	S8 (32mm)		59	72	2	2.9	TAB前
4655		0.06>	23				92	71	2.3	2.8	TAB後
4672	93. 3. 11	4.97	5000<	HCC	右葉にmass		246	64	1.1	3.7	
4682		0.06>	110	HCC(C)	S8 (30mm), S6 (10mm)		57	67	0.8	3.1	
4694	93. 3. 24	0.1	77	HCC(C)	両葉に多発性mass		233	180	1.1	3.2	
4702	93. 3. 25	0.06	18000	HCC, LC(C)	両葉に多発		58	32	1.2	2.9	
4704	93. 3. 25	0.06	29	HCC(C)	両葉に多発		154	132	1.8	2.7	TAB前
4722	93. 3. 29	0.09	18000	HCC(C)	両葉に多発		149	101	1.5	2.7	
4724	93. 3. 30	0.06>	26	HCC(C)	両葉に多発		790	755	3.1	2.7	TAB後
5172	93.11. 1	0.06>	3000	HCC(C)	S5 (25), S8 (20), S3 (15)		91	83	1.3	2.5	TAB前
5173		0.06>	3800		S5 (25), S8 (20), S3 (15)		124	90	1.8	2.7	TAB後
5247	93.12. 5	7.3	15	HCC(C)	S5の圧縮収縮		87	33	1.2	3.1	
5273		0.06>	7.4	HCC(C)	S8, S4にSUL		163	140	0.6	4.1	
5275		0.06>	9.3	HCC(C)	S2に中40mm		41	37	0.5	2.6	
4751	93. 4. 9	0.97	2000	HCC(C)	S7 (70mm)		36	28	0.6	3.7	TAB前
4762	93. 4. 16	0.32	1500		S7 (70mm)		43	94	1.6	3.2	TAB後
4763		0.06>	1400	HCC(C)	S8, S8に中30mm, 多発性		68	71	0.5	3.5	TAB前
4787		0.06>	780		S6, S8に中30mm, 多発性		109	106	0.8	2.7	TAB後

【0048】

【表11】

Sample No	採種日	本発明測定 キット Au/ml	AFP ng/ml	診断名	潜在、分布	PV or HW	GOT	GPT	T.Bili	Alb	その他
4800	93.4.26	0.06	290	HCC(C)	S6(39mm)		28	23	0.5	4	TAE前
4821	94.4.30	0.06	220		S6(39mm)		178	319	0.4	3.2	TAE後
4886		0.06	190	HCC(C)	S8.4に中15mm		77	99	0.4	3.9	Stage 1
4942		0.06	37	HCC(C)	S4に70x40mm		100	173	2.3	2.6	TAE前
4949		0.06	40		S4に70x40mm		100	78	2	2.9	TAE後
4985		0.06	100	CH(C)			110	171	0.6	3.6	
4989		0.06	10	HCC(nonB, C)	S8(39mm)		53	33	0.7	3.1	
5045		0.06	11	CH(C)			53	76	0.8	3.8	
5049		0.06	670	HCC(C)	S8(31mm), S3(20mm)		57	40	1.4	2.9	
5057		0.06	1100	HCC	両側に多発		39	32	1.6	2.6	
5073	93.10.1	0.4	12000	HCC(C)	S4-8に多数80L		46	77	0.6	4.2	
5077		0.06	3.1	LC(C)			31	23	0.4	3.9	
5085		0.06	130	HCC(C)	S4に中50mm		110	99	0.8	3.4	
5093		0.06	13	CH(C)			53	47	0.6	3.6	
5099		0.06	90	HCC(C)	両側に無数		52	36	1	2.5	
5101		0.06	79	HCC(C)	S6(50mm), S8		27	24	0.6	2.8	
5148		0.06	1600	HCC(C)	S5-7にmass		68	36	0.5	2.8	
5152		0.06	150	HCC(C)	S8(37mm)		50	26	0.7	3.6	Stage 2, 肺ガン

【0049】

【表12】

採種日	Sample NO	本発明判定 キット Au/ml	AFP ng/ml	診断名	潜在、分布	PV or HV	GOT	GPT	T.Bili	A1b	その他
93.4.16	4768	0.04	20000	HCC(C)	肝 癌		77	52	1.6	3.1	脳出血して入院
93.4.16	4770	1.9	1.0>	HCC(B)	S4-8に中6mm SOL		44	64	0.5	4	
93.4.2	4783	0.03>	8.2	HCC(C)	S5.6.12に中10mm SOL		62	75	0.6	3.8	
93.4.30	4807	0.4	78	HCC(C)	同様に多発性SOL		83	76	0.6	3.5	
93.4	4811	0.03>	7800	HCC(C)	S8に中34mm		133	111	1.1	3.5	
93.5.14	4840	0.03>	1480	HCC	CT, USのSOL		28	16	1.4	4	H4.4肝右葉切除
93.5.14	4842	0.03>	9	CH(C)			18	16	0.5	3.9	
93.5.17	4850	0.03	8.2	HCC(nonB, nonC)	S3に中9mm S8(20mm)		46	25	0.6	3.2	
93.5.21	4856	0.03>	1460	HCC(C)	明らかでないmassなし		75	87	0.5	3.8	
93.5.21	4858	4.5		HCC(C)	S8.12に6cm		79	48	0.9	3	
93.5.21	4862	0.03>	280	HCC	New lesionなし		78	66	1	2.9	
94.4.18	5416	0.1	860	HCC(C)	S1.6cm 5-6SOL		61	38	2.5	3.3	4.14 TAB
94.5.9	5433	0.03>	22	HCC(B)	S8中17mm		135	187	0.7	4	
94.5.11	5438	6.4	5500	HCC(B)	右葉に中6mm, sol多数		95	59	1.6	3	
94.5.19	5454	0.2	98000	CAH(C)	S3に中19mm		230	123	1.5	2.8	
94.5.23	5475	0.03>	20000	HCC(C)	同様に多発性SOL		117	64	0.9	3.5	
94.5.30	5487	1.2	650	HCC(C)	多発性SOL	PV	136	147	2	3.6	
94.5.31	5493	0.03>	78	HCC(C)	S2に中20mm		88	100	1	3.3	
94.6.2	5498	0.03>	108	HCC(C)	S4.5.8にmass		75	48	0.7	2.8	

【0050】

【表13】

採種日	Sample No	本発明測定 キット Au/ml	AFP ng/ml	診断名	潜在、分布	PV or EV	GOT	GPT	T.Bili	Alb	その他
94. 6. 7	5508	0.03>	28000	HCC(C)	S2 3.6に中40mm SOL		73	39	1.9	2.3	
94. 6. 23	5524	0.6	8800	HCC(C)	両葉多発性SOL	PV	67	55	1.3	3.1	
94. 6. 24	5528	0.03>	2.6	大腸癌							
94. 6. 30	5546	0.06	300	HCC(C)	S3(9mm), S8(32mm), S7(10mm)		48	38	0.8	3.4	
94. 7. 5	5564	0.2	3.6	HCC(B)	S7-8に中30mm		80	140	0.4	3.8	Stage 2
94. 7. 5	5568	0.03>	1800	HCC(C)	S6(25mm), 多発性SOL		100	99	1.4	2.5	
94. 7. 6	5572	1.1	28000	HCC(B)	S5-6にmass	PV	337	143	1.2	2.7	
94. 7. 7	5580	0.03	420	HCC(C)	S7に中30mm SOL		109	89	1.4	2.9	
94. 5. 27	6-185	2	365	HCC(B)	両葉に多発性SOL						
	6-303	3.2	440								
	辻井	2.4	340								
92. 3. 6	3821	0.4	220	HCC(C, B)	S6に中40mm	PV	22	30	0.5	3.9	
92. 3. 6	3823	59.2	23000	HCC(mnC, B)	多発性mass		170	227	6.7	3.4	
92. 4. 17	3813	0.03>	13.2	HCC(C)	S4 5.8, 12 にSOL						
92. 4. 21	3825	1.1	1150	HCC	両葉に多発性SOL		88	55	1.1	3	
92. 4. 24	3829	0.03>	280	HCC(C)	S8(26mm), S1.5 にSOL		107	87	1.9	3	
92. 5. 1	3845	0.03>	1	HCC(C)	S9に15x12		45	49	0.5	3.9	
92. 5. 1	3847	0.4	2000	HCC(mnC, B)			123	55	12.1	2.8	併発性黄疸
92. 5. 1	3851	0.03>	730	HCC(C)	S8(23mm), S5(14mm)		158	147	1.2	3	

【0051】

【表14】

採種日	Sample NO	本発明用 キット Au/ml	A F P ng/ml	診断名	潜在、分布	PV or HV	GOT	GPT	T.Bili	Alb	その他
92.5.6	3965	0.2	4.2	HCC(nonC, B)	new lesionなし		47	77	0.6	3.6	
92.5.22	4001	1.5	200	HCC	多発性SOL	PV	95	124	2.1	2.6	
92.5.29	4023	24	1.0	HCC(nonC, B)	中10cmのSOL		56	48	1.3	2.5	
92.6.12	4083	0.04	3.2	HCC(nonC, B)	横隔膜下に大きなSOL		31	26	1.3	4	H3.2肝右葉切除
92.6.17	4073	1.3	195	HCC(C)	多発性SOL		97	117	6.6	3.3	
92.6.26	4096	19	74	HCC(C)	多発性のmass	PV	129	117	1.5	3.9	
92.7.3	4118	0.06	148	HCC(C)	S5に中28mm		70	106	0.7	4	
92.7.3	4120	1.6	185	HCC(C)	S7-8に中55mm SOL		104	105	0.9	3.9	Stage 1
92.7.24	4155	0.03	360	HCC(CD)	両葉に多発性SOL		32	53	0.7	3	
92.7.24	4165	0.03	1	HCC(C)	S8に中20mm		107	134	1.4	3.5	Stage 2
92.8.11	4181	5.4	300	HCC	S8に中50mm SOL		116	89	1.1	3.5	
92.8.14	4193	0.4	54	HCC							
92.8.14	4197	62.3	9000	HCC	両葉に多発性SOL		115	163	0.8	3.9	Stage 4-A
92.8.18	4199	5.9	1.0	HCC(nonB, nonC)	S6-8に11x9cm		37	25	0.9	4.1	
	11井	3.9	440								
92.8.18	4201	0.03	6400	HCC(C)	S5-6に50mmが2つ		41	16	0.9	3.7	咽頭癌術後
92.8.21	4209	0.03	980	HCC(C)	S8(30mm, 18mm)S6		70	55	1.7	2.4	Stage 3
92.8.21	4217	0.03	92	HCC(C)	左葉全体のmass		187	77	2.7	3.2	腹水, L.Nmeta
92.8.21	4219	0.03	2.4	LC(nonB, nonC)			44	19	0.4	4.3	

【0052】

【表15】

採種日	Sample NO	本発明測定キット Au/ml	AFP ng/ml	診断名	存在、分布	PV or HV	GOT	GPT	T.Bili	Alb	その他
92.9.9	4253	1.2	9.4	HCC(C)	両葉に、数カ所		125	65	1	3.6	
92.9.9	4259	0.06	42	HCC(C)	S6-7に数カ所		99	102	0.8	3.8	
92.9.9	4261	3.9	1200	HCC(C)	両葉に多発	PV	60	82	1	3.8	
92.9.11	4271	0.03>	1.0>	HCC(C)	massは、はっきりせず		43	37	1.1	3.9	
92.9.18	4287	0.03>	3	CH(C)			65	94	0.6	3.8	
92.9.25	4301	0.05	9000	HCC(C)	両葉に多発	PV	71	31	1.5	2.9	
92.10.9	4325	7.4		HCC(C)	両葉に多発		115	38	1.8	3	
92.10.14	4335	1.7	3200	HCC(C)	S2,3,7に10-20mmのmass		39	34	0.6	3.2	
92.10.16	4337	0.03>	1.0>	HCC	S4-8にmass (30mm)		131	413	0.9	3.6	
92.10.23	4349	0.03>	7.4	HCC(C)	S8(20mm)		108	95	0.3	3.7	
92.10.23	4351	0.03>	7.6	HCC(C)	S5(6mm)		31	47	0.7	3.8	
92.10.23	4357	0.06	128	HCC(C)	右葉に多発性mass		65	84	0.6	3.2	
92.10.23	4359	7	82	HCC(C)	diffuse type	PV	213	77	1.3	2.7	

【0053】以上の結果、本発明の混合抗体を使用した測定系では十分な測定結果が得られることが判明した。

【発明の効果】肝癌由来細胞が産生するPIVKA-2を免疫原に用いて得られたPIVKA-2を認識するモノクローナル抗体のうちその少なくとも2種を混合して用いることで優れた感度を達成できる。特にこの混合抗体を固相化した測定系では、予想外にたとえプロトンピンを認識する抗PIVKA-2抗体を用いても、特異的にPIVKA-2を測定できる。こうしてPIVKA*

*-2を特異的にかつ簡単に測定でき、肝癌マーカーとして診断などに応用することが可能である。

【図面の簡単な説明】

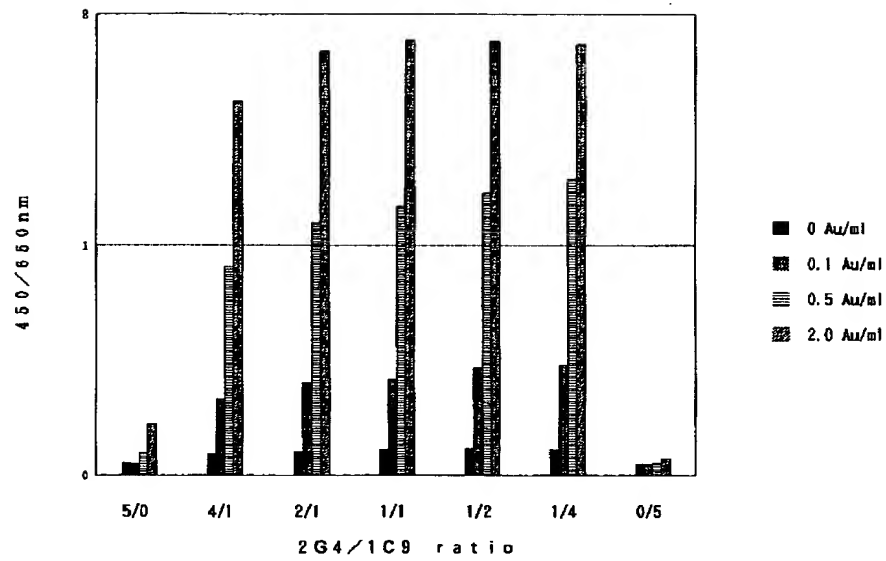
【図1】PIVKA-2測定における2G4/1C9抗体混合物の混合比と反応性との関係を示す。

【図2】PIVKA-2測定における2G4/1C9抗体混合物の混合比と反応性との関係を示す。

【図3】2G4/1C9抗体混合物の混合比とプロトンピンとの反応性の関係を示す。

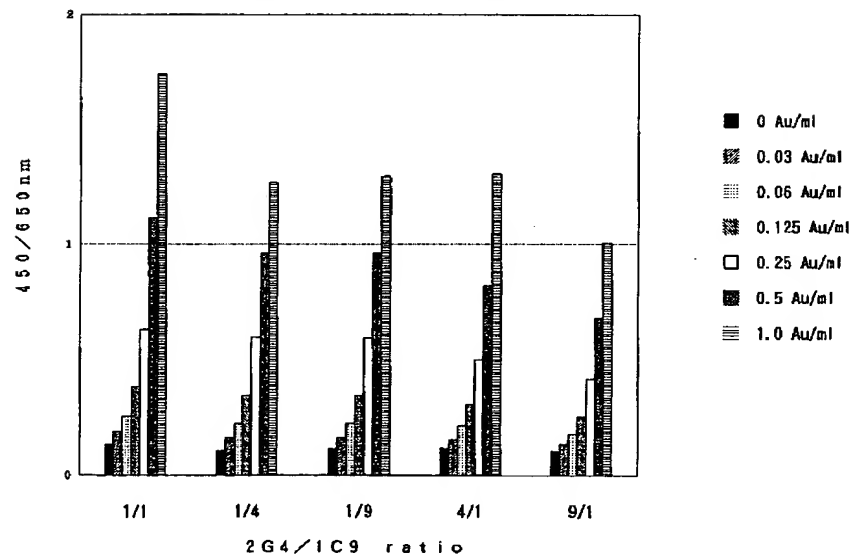
【図 1】

図 1 2G4/1C9 抗体の混合比と反応性



【図 2】

図 2 混合抗体とPIVKA-2との反応性



【図3】

図3 混合抗体とプロトロンビンとの反応性
(緩衝液系における反応)

